

**СОЗДАНИЕ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ОСНОВЕ 10-ГО ДОМЕНА
ФИБРОНЕКТИНА III ТИПА**

Я.Г. Сизенцова

Научный руководитель: к.б.н., С.В. Кулемзин

Новосибирский Государственный Университет, Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, 630090

E-mail: sizentsova.yana@mcb.nsc.ru

**DEVELOPMENT OF CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS BASED ON THE 10TH FIBRONECTIN
TYPE III DOMAIN**

Y.G. Sizentsova

Scientific Supervisor: S.V. Kulemzin, Ph.D.

Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk, Pirogova str., 2, 630090

E-mail: sizentsova.yana@mcb.nsc.ru

Abstract. *Most of the CARs employ single-chain fragment of antibodies (scFv) as a target recognition module. ScFv, however, has some weak points, namely two-domain format and almost 30kDa weight. Here we describe CAR with the 10th human fibronectin type III domain as alternative antigen recognition module of CAR. We designed and developed mono- and bispecific Fn3CARs as a recognition module and proved their functionality.*

Введение. Одним из новых подходов к лечению злокачественных новообразований является клеточная иммунотерапия, основанная на адоптивном переносе модифицированных иммунных клеток, обеспечивающих выраженный противоопухолевый эффект. Значительные успехи были достигнуты при терапии CAR Т-лимфоцитами. CAR (Chimeric antigen receptor – химерный антигенный рецептор) – искусственно созданный рецептор, состоящий из внутриклеточной сигнальной части, трансмембранного участка и антигенраспознающего домена. В качестве антигенраспознающего домена обычно используют фрагмент антител в формате scFv (single chain variable fragment). ScFv представляет собой единую полипептидную цепь, в которой вариабельные домены легкой и тяжелой цепи иммуноглобулинов соединены линкером. В общем виде терапия CAR Т-лимфоцитами проводится следующим образом: в Т-клетки, выделенные из крови пациента, вводят генетические кассеты, кодирующие CAR необходимой специфичности, затем CAR Т-лимфоциты размножают и вводят обратно пациенту. Модифицированные таким образом Т-клетки приобретают способность распознавать опухолевые антигены при помощи антигенраспознающего модуля CAR, а внутриклеточный сигнальный участок CAR запускает активацию Т-лимфоцитов, что приводит к уничтожению раковых клеток. Эффективность CAR Т-клеточной терапии подтверждается рядом клинических испытаний, особенно при терапии гемобластозов [1,2]. Однако она может сильно снижаться при появлении и селективном размножении раковых клеток, на которых отсутствует или снижена экспрессия целевого антигена. Одной из стратегий, позволяющих решить проблему опухолевого ускользания, является создание CAR с двойной специфичностью. Получение таких CAR на основе scFv осложняется большим размером и низкой стабильностью последних в составе полидоменных белков. В настоящее время активно идет поиск новых белковых молекул, которые могут использоваться в качестве альтернативного антигенраспознающего модуля в составе CAR. Мы

предлагаем использовать для этой цели 10-ый домен фибронектина III типа (Fn3) человека. Fn3 имеет Ig-подобную структуру вариабельных доменов: антипараллельные β -складки с тремя петлями, которые аналогичны антигенраспознающим петлям иммуноглобулинов [3]. В эти петли можно вносить мутации, что делает возможным создание искусственных Fn3 со специфичностями к различным антигенам. Значительным преимуществом Fn3 является его небольшой размер (~10кДа) и высокая стабильность. Учитывая, что в природных белках Fn3-домены независимы друг от друга и образуют стабильные мультидоменные структуры, мы предположили, что на основе нескольких модулей Fn3 можно создавать полиспецифические CAR.

Материалы и методы исследования. Ранее в лаборатории иммуногенетики было разработано одиннадцать лентивирусных конструкций, три из которых кодируют Fn3-CAR, специфичные к VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2 – рецептор-2 васкулярного эндотелиального фактора роста), IGF-1R (Insulin-like growth factor 1 receptor – рецептор-1 инсулиноподобного фактора роста) или CEA (Carcinoembryonic antigen – карциноэмбриональный антиген), а другие восемь – биFn3-CAR к этим же мишеням. При помощи кальций-фосфатной трансфекции были получены лентивирусные частицы, которыми затем были трансдуцированы клетки Т-лимфомы Jurkat. Для активационного анализа инкубацию Fn3-CAR Jurkat с клетками-мишенями, экспонирующими VEGFR2, IGF-1R или CEA, проводили в соотношении 1:1. Процент CD69-положительных Fn3-CAR Jurkat Т-клеток детектировали с помощью метода проточной цитометрии.

Результаты. На первом этапе работы были получены три Т-клеточные линии Jurkat, стабильно экспрессирующие моноспецифические Fn3-CAR против VEGFR2, IGF-1R или CEA. Следует отметить, что клетки Jurkat не обладают цитотоксической активностью, поэтому функциональность CAR в контексте этих клеток определяют по способности CAR индуцировать специфическую активацию. Для проверки работоспособности каждого моноFn3-модуля, полученные CAR Т-клеточные линии были проинкубированы с клетками, несущими на своей поверхности соответствующую мишень (VEGFR2, IGF-1R или CEA). В качестве мишеней мы использовали HEK-293 Т (IGF-1R+), HEK-293 Т, транзитно экспрессирующую CEA, и HEK-293 Т 166, эктопически экспрессирующую VEGFR2. FACS анализ показал, что уже через 4 часа после начала инкубации с мишенями все CAR запускали бурную активацию клеток Jurkat, что проявлялось в экспрессии маркера ранней активации CD69. Таким образом, Fn3-домены могут служить распознающими модулями в составе CAR. На втором этапе работы мы получили восемь линий Jurkat, конститутивно экспрессирующих биFn3-CAR, специфические к VEGFR2, IGF-1R и CEA в разных вариантах. Для того, чтобы проверить работоспособность индивидуальных Fn3-доменов в составе биFn3-CAR, мы провели инкубацию полученных Fn3-CAR Jurkat с соответствующими мишенями. Через 4 часа после взаимодействия с клетками-мишенями биFn3-CAR Jurkat клетки успешно активировались (Рис. 1). Было установлено, что каждый Fn3-домен в составе CAR активировался независимо от другого Fn3-домена, из чего можно сделать вывод о работоспособности каждого Fn3-домена в CAR.

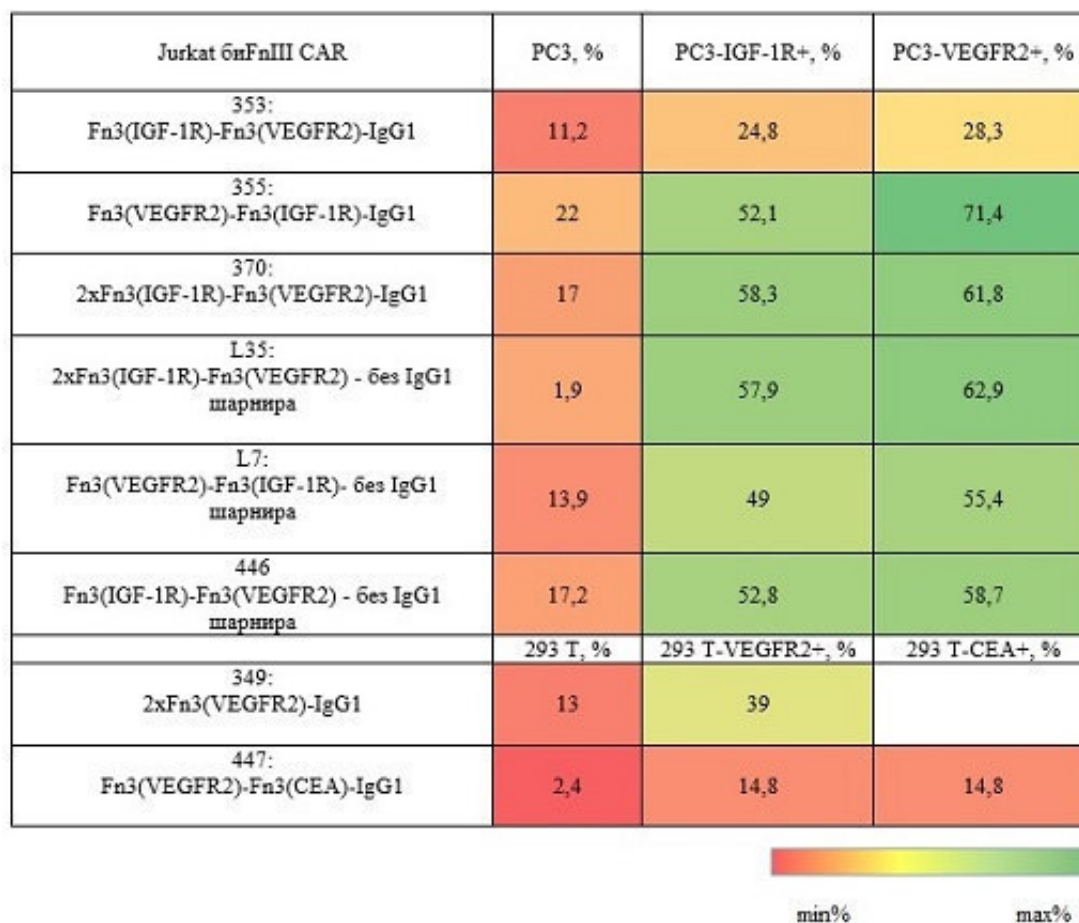


Рис. 1. Активирующие свойства бнFn3-CAR против VEGFR2, IGF-1R и CEA. Указаны проценты CD69+ Fn3 CAR-Jurkat клеток

Закключение. Таким образом, нами впервые была показана способность Fn3 выступать в роли антигенраспознающего модуля в составе химерного антигенного рецептора и возможность создания биспецифических химерных антигенных рецепторов на основе Fn3 доменов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brentjens, R. J., Rivière, I., Park, J. H., Davila, M. L., Wang, X., Stefanski, J. et al (2011). Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. Blood, vol. 118, no.18, pp. 4817-4828.
2. Till, B. G., Jensen, M. C., Wang, J., Qian, X., Gopal, A. K., Maloney, D. G. et al. (2012). CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB. Blood, vol. 119, no.17, pp. 3940-3950.
3. Koide, S., Koide, A. & D. Lipovšek (2012). Target-binding proteins based on the 10th human fibronectin type III domain (¹⁰Fn3). Methods Enzymol, vol. 503, pp. 135-156.